

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-20386

(P2004-20386A)

(43) 公開日 平成16年1月22日(2004.1.22)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
GO1N 33/53	GO1N 33/53	M 2G045
C12M 1/00	C12M 1/00	A 4B024
C12N 15/09	C12Q 1/68	A 4B029
C12Q 1/68	GO1N 27/30	A 4B063
GO1N 27/30	GO1N 27/30	B

審査請求 未請求 請求項の数 16 O L (全 23 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-175991 (P2002-175991)	(71) 出願人	000003159
(22) 出願日	平成14年6月17日 (2002.6.17)		東レ株式会社
			東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号
		(72) 発明者	日笠 雅史
			滋賀県大津市園山1丁目1番1号 東レ株
			式会社滋賀事業場内
		(72) 発明者	窪野 邦久
			滋賀県大津市園山1丁目1番1号 東レ株
			式会社滋賀事業場内
		Fターム(参考)	2G045 AA35 DA12 DA13 DA14 DA30
			DA36 DA37 FB02 FB03 FB05
			FB07 FB12
			4B024 AA19 CA01 HA19
			4B029 AA07 FA12
			4B063 QA13 QQ42 QR32 QS34

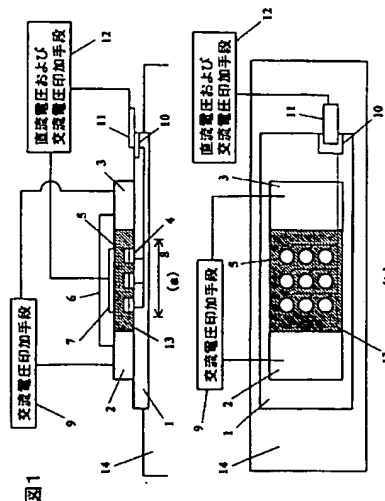
(54) 【発明の名称】 選択結合性物質のハイブリダイゼーション方法とハイブリダイゼーション装置および選択結合性物質固定用基材

## (57) 【要約】

【課題】 選択結合性物質の反応時間を短縮でき、反応の偏りがなく効率的なハイブリダイゼーション方法を提供する。

【解決手段】 基材上に選択結合性物質を固定化し、該選択結合性物質と選択的に結合する対応選択結合性物質を含む被検試料溶液を前記固定化選択結合性物質と接触させ、前記選択結合性物質と前記対応選択結合性物質を結合反応させる工程において、前記選択結合性物質を固定化した固定化部位の面に垂直な軸に交差する方向で、且つ前記選択結合性物質固定化領域の両端より外側に配置した対向する2つの平行移動用電極間に交流電圧を印加し、前記基材の前記選択結合性物質を固定化した部位の直下に配設した垂直移動用下部電極と、前記被検試料溶液を介して前記選択結合性物質固定化面と対向する位置に配置した垂直移動用上部電極間に電圧を印加し、前記結合反応を行わせる選択結合性物質のハイブリダイゼーション方法とハイブリダイゼーション装置および選択結合性物質固定用基材。

【選択図】 図1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

基材上に選択結合性物質を固定化し、該選択結合性物質と選択的に結合する対応選択結合性物質を含む被検試料溶液を前記固定化選択結合性物質と接触させ、前記選択結合性物質と前記対応選択結合性物質を結合反応させる工程において、前記選択結合性物質を固定化した固定化部位の面に垂直な軸に交差する方向で、且つ前記選択結合性物質固定化部位の両端より外側に配置した対向する2つの平行移動用電極間に交流電圧を印加し、前記基材の前記選択結合性物質を固定化した部位の直下に配設した垂直移動用下部電極と、前記被検試料溶液を介して前記選択結合性物質固定化面と対向する位置に配置した垂直移動用上部電極間に電圧を印加し、前記結合反応を行わせる選択結合性物質のハイブリダイゼーション方法。

10

## 【請求項2】

前記選択結合性物質固定化部位が複数配列された選択結合性物質配列領域が存在し、前記平行移動用電極が該選択結合性物質配列領域の両端より外側に配置される請求項1に記載の選択結合性物質のハイブリダイゼーション方法。

## 【請求項3】

前記平行移動用電極間に交流電圧を印加する期間と、前記垂直移動用下部電極と垂直移動用上部電極間に電圧を印加する期間が交互に存在する請求項1に記載の選択結合性物質のハイブリダイゼーション方法。

## 【請求項4】

前記垂直移動用下部電極と垂直移動用上部電極間に印加する直流電圧が、前記垂直移動用下部電極側が垂直移動用上部電極に対して正電位である請求項3に記載の選択結合性物質のハイブリダイゼーション方法。

20

## 【請求項5】

前記垂直移動用下部電極と垂直移動用上部電極間に印加する電圧が、前記垂直移動用下部電極側が垂直移動用上部電極に対して正電位であり、かつ直流成分と交流成分が混在する電圧印加パターンを有する請求項3に記載の選択結合性物質のハイブリダイゼーション方法。

## 【請求項6】

前記選択結合性物質が、核酸、タンパク質、糖類、抗体および抗原性化合物から選ばれる少なくとも1種である請求項1～5いずれか1項に記載の選択結合性物質のハイブリダイゼーション方法。

30

## 【請求項7】

前記選択結合性物質および前記対応選択結合性物質が一本鎖核酸であり、前記結合反応が核酸間のハイブリダイゼーションである請求項6に記載の選択結合性物質のハイブリダイゼーション方法。

## 【請求項8】

基材上に選択結合性物質を固定化し、該選択結合性物質と選択的に結合する対応選択結合性物質を含む被検試料溶液を前記固定化された選択結合性物質と接触させ、前記選択結合性物質と前記対応選択結合性物質を結合反応させる装置であって、前記基材を設置する基台と、前記選択結合性物質を固定化した面の垂直軸に交差する方向で、且つ前記選択結合性物質固定化領域の両端より外側に配置した対向する2つの平行移動用電極と、該平行移動用電極間に交流電圧を印加する交流電圧印加手段と、前記基材上の前記選択結合性物質を固定化した部位の直下に配設した垂直移動用下部電極と、前記被検試料溶液を介して前記選択結合性物質固定化面と対向する位置に配置した垂直移動用上部電極と、該垂直移動用上部電極と前記垂直移動用下部電極間に直流電圧および／又は交流電圧を印加する直流・交流印加手段とを有する選択結合性物質のハイブリダイゼーション装置。

40

## 【請求項9】

前記平行移動用電極、前記垂直移動用上部電極の材質が、それぞれ白金、チタン、金、銀、アルミニウム、銅、パラジウムの金属単体あるいはそれらの合金、炭素あるいは炭素化

50

合物、または導電性ポリマーから選ばれる少なくとも1種である請求項8に記載の選択結合性物質のハイブリダイゼーション装置。

【請求項10】

基材上に選択結合性物質を固定化し、該選択結合性物質と選択的に結合する対応選択結合性物質を含む被検試料溶液を前記固定化された選択結合性物質と接触させ、前記選択結合性物質と前記対応選択結合性物質を結合反応させるための基材であって、基材上の選択結合性物質を固定化する、選択結合性物質固定用部位と、選択結合性物質固定用領域の両端より外側に配置された対向する2つの平行移動用電極と、前記選択結合性物質固定用部位の直下に配設した垂直移動用下部電極と、該垂直移動用下部電極につながる導電パターン配線とを有する選択結合性物質固定用基材。

10

【請求項11】

前記選択結合性物質固定用部位が複数存在し、それらが配列された選択結合性物質配列領域が存在し、前記電極は、該選択結合性物質配列領域の両端より外側に配列される請求項10に記載の選択結合性物質固定用基材。

【請求項12】

前記選択結合性物質固定用部位が基材上に設けられた凸部又は凹部である請求項10または11に記載の選択結合性物質固定用基材。

【請求項13】

前記選択結合性物質固定用部位が、前記基材に設けられた孔に挿入された繊維又は該繊維束である請求項12に記載の選択結合性物質固定用基材。

20

【請求項14】

前記選択結合性物質が、核酸、タンパク質、糖類、抗体および抗原性化合物から選ばれる少なくとも1種である請求項10～13いずれか1項に記載の選択結合性物質固定用基材。

【請求項15】

前記選択結合性物質および前記対応選択結合性物質が一本鎖核酸であり、前記結合反応が核酸間のハイブリダイゼーションである請求項14に記載の選択結合性物質固定用基材。

【請求項16】

前記平行移動用電極および／又は前記垂直移動用下部電極の材質が、それぞれ白金、チタン、金、銀、アルミニウム、銅、パラジウムの金属単体あるいはそれらの合金、炭素あるいは炭素化合物、または導電性ポリマーから選ばれる少なくとも1種である請求項10～15いずれか1項に記載の選択結合性物質固定用基材。

30

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、被検物質と選択的に結合する物質（本明細書において「選択結合性物質」）と、被検物質（本明細書において「対応選択結合性物質」）との結合反応方法、そのための装置および基材に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

40

各種生物の遺伝情報解析の研究が始められており、ヒト遺伝子をはじめとして、多数の遺伝子とその塩基配列、また遺伝子配列にコードされる蛋白質およびこれら蛋白質から二次的に作られる糖鎖に関する情報が急速に明らかにされつつある。配列の明らかにされた遺伝子、蛋白質、糖鎖などの高分子体の機能については、各種の方法で調べることができる。主なものとしては、核酸についてはノーザンハイブリダイゼーション、あるいはサザンハイブリダイゼーションのような、各種の核酸／核酸間の相補性を利用して各種遺伝子とその生体機能発現との関係を調べることができる。蛋白質については、ウェスタンハイブリダイゼーションに代表されるような、蛋白質／蛋白質間の反応を利用し蛋白質の機能および発現について調べることができる。

【0003】

50

近年、多数の遺伝子発現を一度に解析する手法としてDNAマイクロアレイ法（DNAチップ法）と呼ばれる新しい分析法、ないし方法論が開発され、注目を集めている。これらの方法は、いずれも核酸／核酸間ハイブリダイゼーション反応に基づく核酸検出・定量法である点で原理的には従来の方法と同じであり、蛋白質／蛋白質間あるいは糖鎖／糖鎖間や糖鎖／蛋白質間のハイブリダイゼーションに基づく蛋白質や糖鎖検出・定量にも応用が可能である。これらの技術は、マイクロアレイ又はチップと呼ばれる平面基板片上に、多数のDNA断片や蛋白質、糖鎖が高密度に整列固定化されたものが用いられている点に大きな特徴がある。マイクロアレイ法の具体的使用法としては、例えば、研究対象細胞の発現遺伝子等を蛍光色素等で標識したサンプルを平面基板片上でハイブリダイゼーションさせ、互いに相補的な核酸（DNAあるいはRNA）同士を結合させ、その箇所を蛍光色素等でラベル後、高解像度解析装置で高速に読みとる方法や、電気化学反応にもとづく電流値等の応答を検出する方法が挙げられる。こうして、サンプル中に含まれる遺伝子の種類を迅速に推定できる。

10

#### 【0004】

一方、核酸／核酸間ハイブリダイゼーションに使用される核酸溶液は貴重であるため、できるだけ核酸の量を少なくしてハイブリダイゼーション反応を行わせることが望ましく、その為に核酸溶液の核酸濃度を低くすることが考えられ、低濃度の核酸溶液とのハイブリダイゼーションにおいて効率を良くすることが必要となる。しかしながら従来用いられている、平面基板片上に多数のDNA断片やタンパク質、糖鎖などの選択結合性物質が高密度に整列固定化されたマイクロアレイ、あるいは前記選択結合性物質が多孔質中空繊維内部に固定化された該多孔質中空繊維を結束固定し、配列体の繊維軸と交差する方向に切断して薄片とし、前記選択結合性物質を繊維内部に固定した二次元高密度繊維配列体としたマイクロアレイ、あるいは繊維表面に前記選択結合性物質が高密度に整列固定化され、繊維を三次元構造体として配列したマイクロアレイなどにおいては、ハイブリダイゼーション反応を選択結合性物質の自然拡散に依存しており、少量の選択結合性物質を含む溶液を用いて効率よくハイブリダイゼーション反応を起こさせ、貴重な選択結合性物質を有効に利用することが困難である。

20

#### 【0005】

そこで、前記マイクロアレイの基板上に導電体層を有する標本核酸固定部位を配設し、該標本核酸固定部位にプラス電位を印加して電場をつくり、前記核酸溶液中の検体核酸を前記標本核酸固定部位近傍に引き寄せ、標本核酸固定部位近傍の核酸濃度を局所的に高め、ハイブリダイゼーション効率を上げる試みもなされている（特開平8-154656号公報）。

30

#### 【0006】

蛋白質や糖鎖を用いたマイクロアレイについても、これら核酸を用いたマイクロアレイ同様の効果が期待される。

#### 【0007】

しかしながら、前記導電体層を用いた方法では検体核酸および標本核酸固定部位に固定された標本核酸が標本核酸固定部位に電気的に吸着されてしまうため、核酸の移動が制限され、ハイブリダイゼーションは検体核酸が標本核酸固定部位に引き寄せられる期間に起こる核酸間の衝突で飽和し、ハイブリダイゼーション時間を長くしても未反応の核酸が多数残り、ハイブリダイゼーション反応に少量の検体核酸を有効に利用することに限界がある。したがって、この非効率性を解消すべく発明された電氣的吸引による選択結合性物質のハイブリダイゼーション反応の効率化方法においても効率化は十分ではなかった。

40

#### 【0008】

##### 【発明が解決しようとする課題】

このような状況下、高価な核酸、蛋白、糖鎖、抗体、抗原などの高分子体試料を少量でかつ有効に利用できるハイブリダイゼーションの方法を確立することは、今後重要性を増すと考えられる高分子体解析に強く求められるものである。

#### 【0009】

50

本発明は以上説明したような従来の欠点を解消し、少量の選択結合性物質を有効に利用してハイブリダイゼーション反応を短時間で行わせるハイブリダイゼーション方法、ハイブリダイゼーション装置および選択結合性物質固定用基材を提供することをその目的としている。

#### 【0010】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者等は、上述の如き課題を解決すべく、鋭意検討を重ねた結果、ハイブリダイゼーション反応期間中、対応選択結合性物質をマイクロアレイ基板、あるいは磁柱上に固定した前記選択結合性物質近傍で常時移動させ、前記選択結合性物質と前記対応選択結合性物質の衝突確率を高めることによりハイブリダイゼーション反応の効率を高め、結合反応の均一性を向上させ得ることを見だし、本発明を完成するに至った。

#### 【0011】

すなわち、本発明は、

(1) 基材上に選択結合性物質を固定化し、該選択結合性物質と選択的に結合する対応選択結合性物質を含む被検試料溶液を前記固定化選択結合性物質と接触させ、前記選択結合性物質と前記対応選択結合性物質を結合反応させる工程において、前記選択結合性物質を固定化した固定化部位の面に垂直な軸に交差する方向で、且つ前記選択結合性物質固定化部位の両端より外側に配置した対向する2つの平行移動用電極間に交流電圧を印加し、前記基材の前記選択結合性物質を固定化した部位の直下に配設した垂直移動用下部電極と、前記被検試料溶液を介して前記選択結合性物質固定化面と対向する位置に配置した垂直移動用上部電極間に電圧を印加し、前記結合反応を行わせる選択結合性物質のハイブリダイゼーション方法、

(2) 基材上に選択結合性物質を固定化し、該選択結合性物質と選択的に結合する対応選択結合性物質を含む被検試料溶液を前記固定化された選択結合性物質と接触させ、前記選択結合性物質と前記対応選択結合性物質を結合反応させる装置であって、前記基材を設置する基台と、前記選択結合性物質を固定化した面の垂直軸に交差する方向で、且つ前記選択結合性物質固定化領域の両端より外側に配置した対向する2つの平行移動用電極と、該平行移動用電極間に交流電圧を印加する交流電圧印加手段と、前記基材上の前記選択結合性物質を固定化した部位の直下に配設した垂直移動用下部電極と、前記被検試料溶液を介して前記選択結合性物質固定化面と対向する位置に配置した垂直移動用上部電極と、該垂直移動用上部電極と前記垂直移動用下部電極間に直流電圧および／又は交流電圧を印加する直流・交流印加手段とを有する選択結合性物質のハイブリダイゼーション装置、

(3) 基材上に選択結合性物質を固定化し、該選択結合性物質と選択的に結合する対応選択結合性物質を含む被検試料溶液を前記固定化された選択結合性物質と接触させ、前記選択結合性物質と前記対応選択結合性物質を結合反応させるための基材であって、基材上の選択結合性物質を固定化する、選択結合性物質固定用部位と、選択結合性物質固定用領域の両端より外側に配置された対向する2つの平行移動用電極と、前記選択結合性物質固定用部位の直下に配設した垂直移動用下部電極と、該垂直移動用下部電極につながる導電パターン配線とを有する選択結合性物質固定用基材である。

#### 【0012】

##### 【発明の実施の形態】

本発明の選択結合性物質のハイブリダイゼーション方法は、ハイブリダイゼーション反応期間中、対応選択結合性物質を固定した選択結合性物質近傍で常時移動させ、選択結合性物質と対応選択結合性物質の衝突確率を高めることで効率よくハイブリダイゼーション反応を行うものであり、選択結合性物質を固定化した固定化部位の面に垂直な軸に交差する方向で、且つ選択結合性物質固定化部位の両端より外側に配置した対向する2つの平行移動用電極間に交流電圧を印加し、選択結合性物質を固定化した部位の直下に配設した垂直移動用下部電極と、被検試料溶液を介して選択結合性物質固定化面と対向する位置に配置した垂直移動用上部電極間に電圧を印加することが重要である。

#### 【0013】

また、本発明のハイブリダイゼーション装置は、上記方法を遂行するために好ましい装置であり、基材を設置する基台と、選択結合性物質を固定化した面の垂直軸に交差する方向で、且つ選択結合性物質固定化領域の両端より外側に配置した対向する2つの平行移動用電極と、該平行移動用電極間に交流電圧を印加する交流電圧印加手段と、基材上の選択結合性物質を固定化した部位の直下に配設した垂直移動用下部電極と、被検試料溶液を介して選択結合性物質固定化面と対向する位置に配置した垂直移動用上部電極と、該垂直移動用上部電極と垂直移動用下部電極間に直流電圧および／又は交流電圧を印加する直流・交流印加手段とを有するものである。

#### 【0014】

本発明において、前記平行移動用電極、垂直移動用上部電極、垂直移動用下部電極（以下、後者2つを指称する場合、垂直移動用電極と言う）に用いることができる材質としては、白金、金、銀、クロム、チタン、ニッケル、アルミニウム、銅、パラジウム等の金属単体、またはこれらの金属の酸化物、窒化物あるいはそれらの合金、炭素あるいは炭素化合物、または導電性ポリマー等が挙げられ、これらの中から選ばれる少なくとも1種が含まれていればよい。

#### 【0015】

金属単体またはこれらの金属の酸化物、窒化物あるいはそれらの合金の特性としては、これらの材質を用いて配設した平行移動用電極間および／又は垂直移動用電極間に電圧を印加することにより前記対応選択結合性物質を含む被検試料溶液を介して該平行移動用電極間および／又は該垂直移動用電極間に電流が流れる為、被検試料溶液と反応し、被検試料溶液中に金属イオンが溶出し難い材質が好ましい。

#### 【0016】

炭素化合物の代表例としては、グラファイト、フラーレン等が挙げられる。

#### 【0017】

導電性ポリマーの代表例としては、ポリアセチレン、ポリピロール、ポリチオフェン、ポリアニリン等が挙げられ、これらの導電性ポリマーと前記金属、炭素化合物などを混ぜ合わせ、導電特性を改良した複合導電性プラスチック等も挙げられる。

#### 【0018】

前記平行移動用電極および／又は前記垂直移動用上部・下部電極の材質が、それぞれ白金、チタン、金、銀、アルミニウム、銅、パラジウムの金属単体あるいはそれらの合金、炭素あるいは炭素化合物、または導電性ポリマーから選ばれる少なくとも1種であることが好ましい。

#### 【0019】

平行移動用電極は後述する理由により、予め選択結合性物質固定用基材上に形成されることが好ましいが、ハイブリダイゼーション装置側に電極を有し、ハイブリダイゼーション準備段階で選択結合性物質固定用基材上に電極を装着する形態でも構わない。

#### 【0020】

従って、本発明において好ましく使用される選択結合性物質固定用基材として、基材上の選択結合性物質を固定化する選択結合性物質固定用部位と、選択結合性物質固定用領域の両端より外側に配置された対向する2つの平行移動用電極と、前記選択結合性物質固定用部位の直下に配設した垂直移動用下部電極と、該垂直移動用下部電極につながる導電パターン配線とを有するものが挙げられる。

#### 【0021】

前記選択結合性物質固定部位の直下に配設する垂直移動用下部電極は、垂直移動用上部電極との間に電流を流すことにより前記対応選択結合性物質を前記選択結合性物質固定部位に引きつける機能を持たせるため、予め選択結合性物質固定用基材上に形成される必要がある。

#### 【0022】

これらの材料を用いて基材上に電極を設置する手段として、電極材料に金属を用いる場合は基材上に平行移動用電極および／又は垂直移動用下部電極の形状の開口を有するマスク

を配置し、スパッタ法、蒸着法により電極を形成する、あるいはメッキ法を用いて厚膜の電極を形成する、さらには金属箔または金属薄板を接着剤で基材に接着することにより電極を形成する等の方法が挙げられる。炭素化合物を用いる場合は、基材上に電極の形状の開口を有するマスクを配置し、スパッタ法を用いて電極を形成することができる。導電性ポリマーを用いる場合は、シルクスクリーン印刷等の印刷法を用いてペースト状の導電性ポリマーを塗布し、紫外線による光硬化法を用いてペーストを硬化させ、電極を形成することができる。

#### 【0023】

また、平行移動用電極を、予めハイブリダイゼーション装置側に配する場合、前記金属材料、炭素化合物、導電性ポリマーを用いて作製した薄板状の電極板をハイブリダイゼーション装置の基台上部に配し、基台状に選択結合性物質固定用基材を載置した後、該電極板を選択結合性物質固定用基材上に装着することにより、電極を形成することが出来る。

#### 【0024】

次に本発明のハイブリダイゼーション方法とハイブリダイゼーション装置および選択結合性物質固定用基材について図面を用いて説明する。

#### 【0025】

本発明のハイブリダイゼーション装置の一態様の断面図を図1(a)に、平面図を図1(b)に示す。また、図2は本発明における選択結合性物質の動作を示す原理図である。なお本発明はこの例に限定されるものではない。

#### 【0026】

図1、図2に示す様に、本発明のハイブリダイゼーション装置は、基台14の上に載置された選択結合性物質固定用基材1と、カバー基材6と、交流電圧印加手段9と、前記カバー基材6上に装着した垂直移動用上部電極7と、直流および交流電圧印加手段12とを備える。選択結合性物質固定用基材1上に設けられた垂直移動用下部電極4上には選択結合性物質固定部位5が配設され、該選択結合性物質固定部位5上に選択結合性物質15が固定され、選択結合性物質15が複数ある選択結合性固定化領域がアレイ状に配列された選択結合性物質配列領域8を形成する。さらに、選択結合性物質固定用基材1上には選択結合性物質配列領域8の両側に平行移動用電極2、3が配設され、これに導電パターン配線10が接続されており、前記平行移動用電極2、3の上にカバー基材6が架設されている。前記平行移動用電極2、3を介して選択結合性物質固定用基材1とカバー基材6に挟まれた空間には前記対応選択結合性物質16を含む被検試料溶液13が満たされる。各垂直移動用下部電極4は、導電パターン配線10とコネクタ11の接触により前記直流電圧および交流電圧印加手段12へ接続される。同様に、垂直移動用上部電極7も前記直流電圧および交流電圧印加手段12へ接続され、平行移動用電極2、3は交流電圧印加手段9に接続される。

#### 【0027】

選択結合性物質固定用基材1としては、ガラス基板やPMMMA、ポリカーボネート等の樹脂を用いることができ、特にハイブリダイゼーションの結果を蛍光で検出するシステムに用いる場合は無蛍光ガラスや自家蛍光が低いPMMMA等が望ましい。またカバー基材6としては、ハイブリダイゼーションに用いる溶液に対する耐薬品性が良好な材料であれば特に限定はしないが、ガラス、ポリプロピレン、ポリカーボネート等を用いることができる。

#### 【0028】

本発明においては、上記したように選択結合性固定化部位が複数配列された選択結合性物質配列領域8が存在し、前記平行移動用電極2、3は該選択結合性物質配列領域8の両端より外側に配置されることが好ましい。

#### 【0029】

前記選択結合性物質配列領域8に選択結合性物質15が配列される形態は2次元平面の格子点上に配列されることが好ましいが、2次元平面の格子点からずれた位置、直線状、あるいは選択結合性物質固定部位5の位置が選択結合性物質固定用基材1の表面に対して高

マが異なることにより、3次元的な配列形態であっても構わない。

【0030】

次に上記ハイブリダイゼーション装置を用いた本発明の選択結合性物質のハイブリダイゼーション方法について説明する。被検試料溶液13を満たした後、直流電圧および交流電圧印加手段12を用いて垂直移動用下部電極4と垂直移動用上部電極7の間に電圧を印加する。ここで印加する電圧は、前記垂直移動用下部電極側4が垂直移動用上部電極7に対して正電位であること、あるいは前記垂直移動用下部電極4側が垂直移動用上部電極7に対して正電位であり、かつ直流成分と交流成分が混在する電圧印加パターンを有することが好ましい。これにより、垂直移動用上部電極7と垂直移動用下部電極4の間に電界が発生し、被検試料溶液13中に自然拡散している対応選択結合性物質16は負電荷を有するため、正電位を有する垂直移動用下部電極4の方向に引き寄せられる。

10

【0031】

ここで、図5を用いて各電極への電圧印加とハイブリダイゼーション効果の関係について説明する。図5は本発明における各電極への電圧印可パターンを示す。前記直流電圧および交流電圧印加手段12の直流および交流電圧ON区間28に両垂直移動用電極に印可する電圧が直流電位の場合、前記対応選択結合性物質16は、垂直移動用下部電極4の方向に引き寄せられ、垂直移動用下部電極4の上に配設した選択結合性物質固定部位5近傍の前記対応選択結合性物質16の濃度が局所的に上昇し、該選択結合性物質固定部位5に固定化した前記選択結合性物質15と前記対応選択結合性物質16との衝突確率が上昇することにより、ハイブリダイゼーションの効率が向上する。しかしながら、この場合は常時、垂直移動用下部電極4の方向への静電引力が働いているため、直流電圧印加時間が長くなると前記対応選択結合性物質16の多くは前記選択結合性物質固定部位5に吸着し、動作の自由度が小さくなることもあり、徐々にハイブリダイゼーションの効率が低下する。これを緩和する策として、本発明においては、直流および交流電圧印加パターン26に示すように前記垂直移動用下部電極4側が垂直移動用上部電極7に対して正電位であり、かつ直流成分と交流成分が混在するパターンで電圧を印加することにより、高い直流電圧区間に強い引力で前記選択結合性物質固定部位5近傍の前記対応選択結合性物質16を引きつけ、選択結合性物質固定部位5近傍の対応選択結合性物質16の濃度を高くしつつ、選択結合性物質15および対応選択結合性物質16の動作の自由度が損なわれるのを避けることができる。従って、電圧印加時間が長くなってもハイブリダイゼーションの効率が低下することはない。

20

30

【0032】

以上説明したように、前記直流電圧および交流電圧印加手段12を用いて前記選択結合性物質固定部位5近傍の前記対応選択結合性物質16の濃度を局所的に高くすることに加え、本発明においては、交流電圧印加手段ON区間29において、交流電圧印加手段9を用いて平行移動用電極2、3の間に、前記選択結合性物質を固定化した面の垂直軸に交差する方向で、交流電圧を印加する（交流電圧印加パターン27）。これにより平行移動用電極2、3間に電界が発生し、対応選択結合性物質16は平行移動用電極2、3間に発生した電界の方向に応じて前記選択結合性物質配列領域8を横切る方向に移動を繰り返す。具体的には、平行移動用電極2がプラス電位、平行移動用電極3がマイナス電位の場合、前記対応選択結合性物質16は平行移動用電極2に引き寄せられ、平行移動用電極2がマイナス電位、平行移動用電極3がプラス電位の場合、前記対応選択結合性物質16は平行移動用電極3に引き寄せられる。このように対応選択結合性物質16を前記選択結合性物質配列領域8を横切って移動させることにより、選択結合性物質固定部位5上に固定された選択結合性物質15と対応選択結合性物質16が領域内で場所による偏りが少なく接触し、ハイブリダイゼーションが均一に起こる。

40

【0033】

このように、ゲート信号25を交流電圧印加手段9と直流電圧および交流電圧印加手段12へ入力し、直流電圧および交流電圧印加手段ON区間28と交流電圧印加手段ON区間29を交互に発生させることにより、低い濃度の前記被検試料溶液13を用いても、高い

50



効率でかつ均一なハイブリダイゼーションを実現でき好ましい。

【0034】

尚、電極に印加する電圧が高いほど、負電荷を有する選択結合性物質15および対応選択結合性物質16が電極から受ける電氣的吸引力あるいは電氣的斥力は強くなり、対応選択結合性物質16の移動による選択結合性物質15との接触の効果が高まることは言うまでもないが、高電圧を長時間印加させると、選択結合性物質15および対応選択結合性物質16が損傷を受けることがある為、本発明においては電極間隔1cm当たり5Vから50Vの間に設定することが好ましく、より安定なハイブリダイゼーション結果を得る為には、電極間隔1cm当たり10Vから25Vとすることがさらに好ましい。

【0035】

以上説明したように、水平方向に発生する交流電界と、垂直方向に発生する交流および直流電界によってハイブリダイゼーションの効率化を図る本発明の方法では、選択結合性物質15と対応選択結合性物質16がハイブリダイゼーションの期間中、常時相対的に移動し、衝突、接触を繰り返す為、ハイブリダイゼーションの効率が高まる。

【0036】

ここで、選択結合性物質固定部位としては、通常基材上に設けた平面上の位置、基材上に設けた凹凸を好ましく用いられるが、選択結合性物質固定用基材1を貫通する孔に棒状の樹脂、ガラス、金属、繊維等を挿し、該樹脂、ガラス、金属、繊維の先端を選択結合性物質固定部位として用いても同様の効果が期待でき、特に基材に設けられた孔に挿入された繊維又は該繊維束であることが好ましい。

【0037】

また、高価な被検試料溶液13の量を少なくする為には前記平行移動用電極2、3はできるだけ薄くすることが好ましく、5μmから200μmが好ましい。このように非常に薄く厚みムラの少ない電極を形成するために、前記電極は予め選択結合性物質固定用基材上に形成されていることが好ましいが、ハイブリダイゼーション装置側に電極を有し、ハイブリダイゼーション準備段階で選択結合性物質固定用基材1上に電極を装着する形態でも構わない。

【0038】

次に図3、図4を用いて従来のハイブリダイゼーション方法および装置について説明する。図3は従来のハイブリダイゼーション装置の断面図であり、図4は従来のハイブリダイゼーション装置における選択結合性物質の動作を示す原理図である。

【0039】

前記したように、従来の方法においては、ハイブリダイゼーション反応は選択結合性物質の自然拡散に依存しているため、前記選択結合性物質と対応選択結合性物質の接触確率は低く、従ってハイブリダイゼーション反応の効率は低かった。そこで、この非効率性を解消すべく提案されたものが図3、図4に示すように電氣的吸引による選択結合性物質のハイブリダイゼーション方法である。

【0040】

図3、図4において、選択結合性物質固定用基材17上に設けられた選択結合性物質固定部位20上に選択結合性物質15'が固定される。選択結合性物質固定用基材17上には、さらに、選択結合性物質15'が配列された領域の外側に支持材18が配設され、支持材18の上にカバー基材21が架設される。前記支持材18を介して選択結合性物質固定用基材17とカバー基材21に挟まれた空間には対応選択結合性物質16'を含む被検試料溶液23が満たされる。被検試料溶液23を満たした後、電圧印加手段24を用いて、垂直移動用上部電極22に負電位を、選択結合性物質固定部位20の直下に配設した垂直移動用下部電極19に正電位を印加することにより、両電極の間に電界が発生し、被検試料溶液23中に自然拡散している対応選択結合性物質16'は負電荷を有するため、前記選択結合性物質固定部位20の方向に吸引される。これにより選択結合性物質固定部位20近傍の対応選択結合性物質16'の濃度が高くなり、あるいは選択結合性物質固定部位20に対応選択結合性物質16'が吸着する過程で選択結合性物質15'と対応選択結合

10

20

30

40

50

性物質16'が接触し、ハイブリダイゼーションが起こる。

【0041】

しかし、図3に示す方法では、対応選択結合性物質16'は電気力により選択結合性物質固定部位20に吸着されてしまい、さらには対応選択結合性物質16'と同じ負電荷を持つ選択結合性物質15'も選択結合性物質固定部位20の表面に吸着されてしまい、選択結合性物質15'と対応選択結合性物質16'の間で相対的な動きが無くなる為、本発明と比べて選択結合性物質と対応選択結合性物質の動的な接触確率が低く、十分なハイブリダイゼーション反応の効率化が得られない。

【0042】

本発明において、「選択結合性物質」とは、被検物質と直接的又は間接的に、選択的に結合し得る物質を意味し、代表的な例として、核酸、タンパク質、糖類及び他の抗原性化合物を挙げることができる。核酸は、DNAでもRNAでもよい。特定の塩基配列を有する一本鎖核酸は、該塩基配列又はその一部と相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸と選択的にハイブリダイズして結合するので、本発明でいう「選択結合性物質」に該当する。また、タンパク質としては、抗体およびFabフラグメントやF(ab')<sub>2</sub>フラグメントのような、抗体の抗原結合性断片、並びに種々の抗原を挙げることができる。抗体やその抗原結合性断片は、対応する抗原と選択的に結合し、抗原は対応する抗体と選択的に結合するので、「選択結合性物質」に該当する。糖類としては、多糖類が好ましく、種々の抗原を挙げることができる。また、タンパク質や糖類以外の抗原性を有する物質（抗原性化合物）を固定化することもできる。「選択結合性物質」としては、核酸、タンパク質、糖類、抗体および抗原性化合物から選ばれる少なくとも1種が好ましく、特に好ましいものは、核酸、抗体及び抗原である。本発明に用いる選択結合性物質は、市販のものでよく、また、生細胞などから得られたものでよい。

【0043】

生細胞からのDNA又はRNAの調製は、公知の方法、例えばDNAの抽出については、Blinらの方法（Blin et al., Nucleic Acids Res. 3: 2303 (1976)）等により、また、RNAの抽出については、Favaloroらの方法（Favaloro et al., Methods Enzymol. 65: 718 (1980)）等により行うことができる。固定化する核酸としては、更に、鎖状若しくは環状のプラスミドDNAや染色体DNA、これらを制限酵素により若しくは化学的に切断したDNA断片、試験管内で酵素等により合成されたDNA、又は化学合成したオリゴヌクレオチド等を用いることもできる。

【0044】

本発明において、前記選択結合性物質および前記対応選択結合性物質が一本鎖核酸であり、前記結合反応が核酸間のハイブリダイゼーションであることが好ましい。

【0045】

個々の選択結合性物質固定部位には、通常、1種類の選択結合性物質が固定されるが、例えば、変異を有する複数種類の遺伝子を同一の選択結合性物質固定部位に結合させたい場合等には、1個の選択結合性物質固定部位に複数種類の選択結合性物質を固定することも可能である。

【0046】

また、複数の選択結合性物質固定部位に固定される選択結合性物質は、それぞれ異なる種類の選択結合性物質としても、同一の選択結合性物質としても構わない。また、複数の選択結合性物質固定部位のうち、一部の複数の選択結合性物質固定部位に1種類の選択結合性物質を固定化し、他の一部の複数の選択結合性物質固定部位に他の1種類の選択結合性物質を固定化することもできる。選択結合性物質の種類、順序は選択結合性物質配列領域の中の位置によって限定されるものでない。同一の選択結合性物質を複数の選択結合性物質固定部位に固定しておき、測定感度をより高くすることも有効である。

【0047】

選択結合性物質の選択結合性物質固定部位への固定は、公知の方法により行うことができ

10

20

30

40

50

る。無修飾の選択結合性物質を選択結合性物質固定部位に固定する場合には、選択結合性物質と選択結合性物質固定部位とを作用させた後、ベーキングや紫外線照射により固定できる。後述の実施例では、この方法によりDNAをスライドガラス基材に固定している。また、アミノ基で修飾された選択結合性物質を選択結合性物質固定部位に固定する場合には、グルタルアルデヒドや1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)等の架橋剤を用いて選択結合性物質固定部位の官能基と結合させることができる。選択結合性物質を含む試料を選択結合性物質固定部位に作用させる際の温度は、5℃～95℃が好ましく、15℃～65℃が更に好ましい。

【0048】

本発明では、選択結合性物質をそのまま選択結合性物質固定部位に固定してもよく、また、選択結合性物質に化学的修飾を施した誘導体や、必要に応じて変性させた核酸を固定化してもよい。核酸の化学的修飾には、アミノ化、ビオチン化、ディゴキシゲニン化等が知られており[CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Ed.: Frederick M. Ausubel et al. (1990)、脱アイソトープ実験プロトコル(1)DIGハイブリダイゼーション(秀潤社)]、本発明ではこれらの修飾法を採用することができる。

【0049】

一例として、核酸へのアミノ基導入に関して説明する。アミノ基を有する脂肪族炭化水素鎖と一本鎖核酸との結合位置は特に限定されるものではなく、核酸の5'末端または3'末端のみならず核酸の鎖中(例えば、リン酸ジエステル結合部位または塩基部位)であってもよい。この一本鎖核酸誘導体は、特公平3-74239号公報、米国特許4,667,025号、米国特許4,789,737号等に記載の方法にしたがって調製することができる。この方法以外にも、例えば、市販のアミノ基導入用試薬[例えば、アミノリンクII(商標名):PEバイオシステムズジャパン社、Amino Modifiers(商標名):クロンテック社]などを用いて、又はDNAの5'末端のリン酸にアミノ基を有する脂肪族炭化水素鎖を導入する周知の方法(Nucleic Acids Res. 11(18), 6513-(1983))にしたがって調製することができる。

【0050】

上述の方法により得られた選択結合性物質固定用基材は、選択結合性物質を選択結合性物質固定領域に固定した後、適当な処理をすることができる。例えば、熱処理、アルカリ処理、界面活性剤処理などを行うことにより、固定された選択結合性物質を変性させることもできる。あるいは、細胞、菌体などの生体材料から得られた選択結合性物質を使用する場合は、不要な細胞成分などを除去してもよい。そして、処理後の選択結合性物質固定用基材を選択結合性物質の検出材料として用いることができる。なお、これらの処理は別々に実施してもよく、同時に実施してもよい。また、選択結合性物質を含む試料を選択結合性物質固定領域に固定する前に適宜実施してもよい。

【0051】

選択結合性物質をアレイ状に配列した本発明の選択結合性物質固定用基材は、固定化された選択結合性物質をプローブとして被検物質と相互作用させることにより、検体中の特定の被検物質を検出することができる。2種類の被検試料に対して、下記に示す標識化(区別が付くように)を行い、その差異を比較することもできる。

【0052】

選択結合性物質と選択的に結合する、被検試料中の対応選択結合性物質の検出には、結合を特異的に認識することができる公知の手段を用いることができる。例えば、検体中の対応選択結合性物質に、蛍光物質、発光物質、ラジオアイソトープなどの標識体を結合し、選択結合反応および洗浄後、この標識体を検出することができる。これら標識体の種類や標識体の導入方法に関しては、免疫測定や核酸のハイブリタイゼーションの測定のために用いられる蛍光物質や発光物質は、この分野において周知であり、種々のものが市販されているので、これらの市販の蛍光物質や発光物質を用いることができる。

【0053】

10

20

30

40

50

また、選択結合性物質固定部位に固定された選択結合性物質と、被検試料中の対応選択結合性物質との結合反応後、若しくは結合反応と同時に、対応選択結合性物質と選択的に結合する、標識化された遊離の測定用物質をさらに反応させ、洗浄後、対応選択結合性物質と選択結合性物質を介して選択結合性物質固定部位に結合された該測定用物質の標識を測定することによっても検出可能である。例えば、選択結合性物質として特定の塩基配列を有する核酸を選択結合性物質固定部位に固定し、対応選択結合性物質が該核酸と相補的な領域を含む核酸である場合に、対応選択結合性物質である該核酸中の、上記選択結合性物質と相補的な領域以外の領域と相補的な核酸を標識して測定用物質として用いることができる。また、選択結合性物質として抗原を選択結合性物質固定部位に固定し、対応選択結合性物質が該抗原と抗原抗体反応する抗体である場合に、該抗体と抗原抗体反応する第2抗体を標識したものを測定用物質として用いることができる。

10

## 【0054】

また、選択結合性物質固定部位に電気伝導性を有する材料を用いた場合、電気化学反応にもとづく電流値等の応答を検出する方法を用いることができる。この場合、電極となる選択結合性物質固定部位に固定した選択結合性物質と対応選択結合性物質を、両者の反応を促進、抑制する反応溶液中で反応させ、かつ、この材料の全部または一部が、結合した選択結合性物質と対応選択結合性物質の中に含有され、反応した後の電極、すなわち選択結合性物質固定部位に流れる電流値を測定することにより、選択結合性物質と対応選択結合性物質の結合の有無、結合の程度を検出できるものである。

## 【0055】

20

本発明のハイブリダイゼーション装置に適用する選択結合性物質固定用基材を用いた測定方法に、選択結合物質および対応選択結合性物質として供せられる被検物質としては、測定すべき核酸、例えば、病原菌やウイルス等の遺伝子や、遺伝病の原因遺伝子等並びにその一部分、抗原性を有する各種生体成分、病原菌やウイルス等に対する抗体等を挙げることができるが、これらに限定されるものではない。また、これらの被検物質を含む検体としては、血液、血清、血、尿、便、髄液、唾液、各種組織液等の体液や、各種飲食物並びにこれらの希釈物等を挙げるることができるがこれらに限定されるものではない。また、被検物質となる核酸は、血液や細胞から常法により抽出した核酸を標識してもよいし、該核酸を鋳型として、PCR等の核酸増幅法によって増幅したものであってもよい。後者の場合には、測定感度を大幅に向上させることが可能である。核酸増幅産物を被検物質とする場合には、蛍光物質等で標識したヌクレオシド三リン酸の存在下で増幅を行うことにより、増幅核酸を標識することが可能である。また、被検物質が抗原又は抗体の場合には、被検物質である抗原や抗体を常法により直接標識してもよいし、被検物質である抗原又は抗体を選択結合性物質と結合させた後、選択結合性物質を固定した選択結合性物質固定部位を洗浄し、該抗原又は抗体と抗原抗体反応する標識した抗体又は抗原を反応させ、被検物質である抗原又は抗体とハイブリダイズすることによって選択結合性物質固定部位に結合した標識を測定することもできる。

30

## 【0056】

固定化した選択結合性物質と被検物質を相互作用させる工程は、従来と全く同様に行うことができる。反応温度及び時間は、ハイブリダイズさせる核酸の鎖長や、免疫反応に関与する抗原及び／又は抗体の種類等に応じて適宜選択されるが、核酸のハイブリダイゼーションの場合、通常、50℃～70℃程度で1分間～数時間、免疫反応の場合には、通常、室温～40℃程度で1分間～数時間程度である。

40

## 【0057】

上記方法により、固定化された選択結合性物質と選択的に結合する核酸や抗体、抗原等の被検物質を測定することができる。すなわち、選択結合性物質として核酸を固定化した場合には、この核酸又はその一部と相補的な配列を有する核酸を測定することができる。また、選択結合性物質として抗体又は抗原を固定化した場合には、この抗体又は抗原と免疫反応する抗原又は抗体を測定することができる。なお、本明細書でいう「測定」には検出と定量の両者が包含される。

50

## 【0058】

本発明を用いることにより、各種生物における、遺伝子や蛋白質、糖鎖の発現を効率的、迅速かつ簡便に調べることができる。例えば、正常ヒト肝臓および肝炎ウイルス感染肝臓から抽出した核酸を標識後、本発明の選択結合性物質固定用基材上に各種既知のヒト遺伝子を固定化した選択結合性物質固定部位のおののみにハイブリダイゼーションを行う。正常肝臓核酸と肝炎肝臓核酸の前記各種既知のヒト遺伝子への結合の程度を比較することにより、肝炎肝臓での遺伝子発現の変化を調べることができる。

## 【0059】

同様に、蛋白質である各種モノクローナル抗体を結合させた繊維配列体に、標識した正常脳抽出蛋白質およびアルツハイマー脳抽出蛋白質を結合させ、結合した蛋白質を正常と比較することによりアルツハイマー脳における蛋白質の異常発現を調べることができる。

## 【0060】

## 【実施例】

本発明を以下の実施例によって更に詳細に説明するが、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

## 【0061】

## 実施例1

本発明の実施例を用いる図1に示すハイブリダイゼーション装置を用いてガラス基材上で核酸の固定およびハイブリダイゼーションが確実に進めることを確認する為に、生物試料に対して交叉反応をせず、熱的にも安定でハイブリダイゼーション時に加える熱で分解しないディゴキシゲニンを標識体として用いた実験を行った。

## 【0062】

アクチン遺伝子の核酸液（宝酒造株式会社製）（該核酸濃度10μg/ml）をアミノ基導入スライドガラス基材（76mm×26mm×1mm）（松浪硝子工業（株）製）上に個々の固定部位のサイズが直径200μm程度となるようにスポッティングし、空气中で乾燥後、紫外線処理（ストラタジーン社製UVクロスリンカーを使用）を行い、核酸が固定化された基材を得た。用いた核酸配列の一部に相補的なオリゴヌクレオチドを合成し、ディゴキシゲニン（DIG: Digoxigenin, ロシュ・ゲイアグノスティックス株式会社）で標識した。

## 【0063】

末端アミノ化されたオリゴヌクレオチドをそれぞれ100 mMホウ酸緩衝液（pH8.5）に終濃度2 mMになるように溶かした。等量のジゴキシゲニン-3-オ-メチルカルボニル-α-アミノカプロン酸-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル（26μg/mlジメチルホルムアミド溶液）を加え、室温にて一晩静置した。グリコーゲン（ロシュ・ゲイアグノスティックス株式会社）をキャリアーとしてエタノール沈殿を行い、沈殿を風乾後、100μmolの10 mM Tris-HCl（pH7.5）、1 mM EDTAに溶かした。こうして得られたDIG標識オリゴヌクレオチドを試料核酸のモデルとして用いた。

## 【0064】

作製した核酸固定基材を核酸固定部位が上向きになるように図1に示すハイブリダイゼーション装置の基台に載置し、前記DIG標識オリゴヌクレオチドをEDTAに溶かした溶液を該核酸固定基材上に滴下し、カバー基材で封止し、前記上下移動用電極、平行移動用電極に電圧を印加せずに、定法により（ロシュ・ゲイアグノスティックス株式会社、製品マニュアルに準じて実施）ハイブリダイゼーションを行った。

## 【0065】

ハイブリダイゼーション終了後、核酸固定基材を洗浄後、抗DIG酵素標識抗体溶液を加え抗原抗体反応を行わせた。反応後、核酸固定基材を洗浄し未結合の抗体を除去した。DIG検出試薬を添加し、平衡化した。水分を切り、光シグナルの検出を行ったところ核酸の固定化に応じてシグナルが検出された。

## 【0066】

これにより、交流電界を印加しない従来方法で本発明のハイブリダイゼーション装置が構造的、あるいは機能上の問題が無く、ハイブリダイゼーション装置として確実に使用出来ることを確認した。

【0067】

#### 実施例2

##### 選択結合性物質固定基材の前処理

スライドガラス(76mm×26mm×1mm)(松浪硝子工業(株)製)を純水、エタノール、NaOHの混合溶液でクリーニングした後、純水で洗浄した。さらに、該スライドガラス上に選択結合性物質固定部位を形成するために、孔径200μmの円形孔を500μm間隔で5mm×5mmの領域に格子状に配列し、それぞれの開口部を幅10μmの開口パターンで接続し、前記ハイブリダイゼーション装置に設けられた電極に接続する電極部を形成するための開口部に前記開口パターンを集束したステンレス製マスクを該スライドガラス上に近接させて装着し、スパッタ法により前記マスクの開口部形状に相当する金電極をスライドガラス上に設けた。電極パターンを配設した面を純水、ポリ-L-リシンの混合溶液(組成:10%ポリ-L-リシン)に浸し、前記選択結合性物質固定部位を含むスライドガラスの表面にアミノ基を導入した。

【0068】

核酸溶液2種類(宝酒造(株)製「λControl Template & Primer Set-A」;製品番号TX803(約1000bpのλDNA断片)、および、宝酒造(株)製「Human TFR(1kb) Template & Primer Set」;製品番号TX806(約1000bpのヒトトランスフェリンレセプターDNA断片))を元に、それぞれの核酸をPCR法により増幅した。PCR法で用いたプライマーは、それぞれの製品に同梱されているものを用いた。これを精製し、精製した核酸溶液をえた。スライドガラスの前記選択結合性物質固定部位に精製した2種類の核酸溶液をスポッティングし、空気中で乾燥後、UVクロスリンク(120mJ)を行い、2種類の核酸が核酸固定部位に固定された核酸固定基材をえた。次に、核酸と反応していないスライドガラス表面の余分なアミノ基をブロックするため、ホウ酸、純水、pH調整用NaOH、無水コハク酸、1-メチル-2-ピロリドンを混合した溶液(無水コハク酸3gを187ml1-メチル-2-ピロリドンに溶解し、使用直前に17ml1M Na-borate (pH8.0)溶液を加えたもの)に核酸が固定された面を浸し、振とうした。その後、洗浄した。

【0069】

##### RNAの処理

RNA溶液(宝酒造(株)製「λPOLY A+RNA-A」;製品番号TX802)を用意した。これは上記核酸の1つ(TX803)と相補的な塩基配列を有している。これを、逆転写酵素「Super Script II」(GIBCO BRL社製;製品番号18064-071)、2.5mM dATP、2.5mM dCTP、2.5mM dGTP、1.0mM dTTP、C×5-dUTP(アマシム・ファルマシア製;製品番号PA55022)と混合し、42℃で1時間インキュベートして逆転写し、C×5色素が取り込まれたcDNA溶液を得た。

【0070】

同様にRNA溶液(宝酒造(株)製「Human TFR RNA(1kb)」;製品番号TX805)を用意し、C×5-dUTPをC×3-dUTP(アマシム・ファルマシア製;製品番号PA53022)と変えた以外は、上記と同じ条件で逆転写し、C×3色素が取り込まれたcDNA溶液を得た。このC×3色素の取り込まれたcDNAは上記核酸の1つ(TX806)と相補的な塩基配列を有している。

【0071】

上記の色素が取り込まれた2種類のcDNA溶液を混合、精製し、さらにバッファー(3.4×SSC、0.1% SDS)に溶解してハイブリダイゼーション溶液を得た。

【0072】

10

20

30

40

50

## ハイブリダイゼーション

2種類の核酸が表面に固定された核酸固定基材をハイブリダイゼーション装置の基台上に固定し、核酸を固定した領域の両側にハイブリダイゼーション装置の交流電圧印加手段に接続された平行移動用電極を配設した。本実施例では厚さ200 $\mu$ mの金薄板を電極として用いた。平行移動用電極の間隔は1cmとした。2種類の核酸を固定した部位に20 $\mu$ lの前記ハイブリダイゼーション溶液を滴下し、核酸固定部位の両側の平行移動用電極上に垂直移動用上部電極を装着したカバー基材を架設し、ハイブリダイゼーション溶液が蒸発しないように密閉した。

## 【0073】

先ず、垂直移動用電極間に、図5の直流電圧および交流電圧印加手段ON区間28における直流および交流電圧印加パターン26に示す電圧パターンを1分間印加し、核酸固定部位近傍のcDNA濃度を高めた。ここで印加する電圧は、最高値が1V、最低値が0V、周波数1Hzとした。

## 【0074】

その後、0.1Hzのゲート信号(Du50%)に合わせて直流および交流混合電圧を垂直移動用両電極間に、交流電圧を平行移動用電極間に図5に示す電圧印加パターンで印加した。ここで印加する電圧は、垂直移動用両電極間には最高値が1V、最低値が0V、周波数1Hzの直流交流混合パターンで、垂直移動用下部電極側が正電位となるように、また、平行移動用電極間には10V、10Hzの交流電圧を印加し、65℃の条件に10分間静置した後、カバー基材、平行移動用電極を取り外し、洗浄した。

## 【0075】

また、垂直移動用電極間に印加する電圧パターンの効果を確認するために、垂直移動用両電極間には最高値が1V、最低値が0Vの直流パターン、平行移動用電極間には10V、10Hzの交流電圧を印加し、65℃の条件に10分間静置した後、カバー基材、平行移動用電極を取り外し、洗浄したサンプルを用意した。

## 【0076】

さらに従来法と比較する為に、平行移動用電極間および垂直移動用電極間に電圧を印加しない状態で65℃の条件で16時間放置したサンプルを用意した。その後、該サンプルのカバー基材、電極を取り外し、洗浄した。

## 【0077】

## 蛍光検出

C $\times$ 5からの蛍光を測定するために、光学系を以下のようにした。まず、蛍光の励起光としてはレーザー(波長635nm)を用いた。まず、バンドパスフィルター(オメガオプティカル製：製品番号X1069)を光軸と垂直に配置し、励起光以外の余計な光を取り除いた。さらに、レーザービームの光軸と45度の角度になるように、ダイクロイックミラー(オメガオプティカル製：製品番号XF2035)を配置し、この集光したビームをDNA溶液に浸した端面と反対のスライドガラス端面に照射した。さらに、DNA溶液に浸した端面から戻ってきた蛍光を、励起光を照射する側の端面側で集光し、先に述べた、ダイクロイックミラー(オメガオプティカル製：製品番号XF2035)を通し、さらにバンドパスフィルター(オメガオプティカル製：製品番号XF3076)を通して、余分な励起光をカットした。

## 【0078】

C $\times$ 3からの蛍光は、ダイクロイックミラーとバンドパスフィルターをC $\times$ 3用のものにし(それぞれオメガオプティカル製：製品番号XF1074、XF2017、XF3083)、照射するレーザーの波長を532nmとした以外は上記と同じ方法で検出した。

## 【0079】

このような方法で、上記のハイブリダイゼーション後の2種類核酸固定部位からの蛍光をC $\times$ 5、C $\times$ 3のそれぞれについて測定した。TX803の核酸溶液をスポットティングした核酸固定部位からは、C $\times$ 5の蛍光のみが観察され、C $\times$ 3の蛍光は検出されなかった。TX806の核酸溶液をスポットティングした核酸固定部位からは、C $\times$ 3だけの蛍光が

10

20

30

40

50

観察され、C×5からの蛍光は検出されなかった。

#### 【0080】

また、このときの電圧を印加した核酸固定基材から得られた蛍光強度は電圧を印加しない従来の方法に比べて同等であった。また、各核酸固定部位内の蛍光強度分布を詳細に観察すると、従来法に比べて本発明の方法の方が均一な強度分布を示した。このように、スライドガラスに導電性パターンを配設し、核酸固定部位近傍の核酸濃度を高くするための電界と、プローブ核酸とターゲット核酸を相対的に移動させ、衝突確率を高めるための電圧を印加することにより、わずか10分のハイブリダイゼーションの時間でも十分な結合反応が行われ、かつ場所による偏りの少ない均一な結合反応状態が得られることが分かった。

10

#### 【0081】

##### 実施例3

##### 選択結合性物質固定基材の前処理

実施例2で用意した、スパッタ法によりスライドガラス上に選択結合成物質固定用部位、それらを接続する導電パターン、電極部を金で配設した基板を用意した。該基板上に、平行移動用電極を形成するために設けた10mm×5mmの開口の10mmの辺が10mmの間隔を隔てて平行に対向するように、2つの開口部と、垂直移動用下部電極と導電パターン配線を形成する為に開口パターンを配置したステンレス製マスクをスライドガラス上に近接させて装着し、スパッタ法により前記マスクの開口部形状に相当する金電極をスライドガラス上に設けた。

20

#### 【0082】

このように金電極を配置したスライドガラス(76mm×26mm×1mm)(松浪硝子工業(株)製)を純水、エタノール、NaOHの混合溶液でクリーニングした後、純水で洗浄した。さらに、クリーニングした面を純水、ポリ-L-リシンの混合溶液(組成:10%ポリ-L-リシン)に浸し、スライドガラスの表面にアミノ基を導入した。

#### 【0083】

核酸溶液2種類(宝酒造(株)製「λControl Template & Primer Set-A」:製品番号TX808(約1000bpのλDNA断片)、および、宝酒造(株)製「Human TFR(1kb) Template & Primer Set」:製品番号TX806(約1000bpのヒトトランスフェリンレセプターDNA断片))を元に、それぞれの核酸をPCR法により増幅した。PCR法で用いたプライマーは、それぞれの製品に同梱されているものを用いた。これを精製し、精製した核酸溶液をえた。スライドガラスの前記金電極の間のアミノ基を導入した面に精製した2種類の核酸溶液をスポッティングし、空気中で乾燥後、UVクロスリンク(120mJ)を行い、2種類の核酸が核酸固定部位に固定された核酸固定基材をえた。次に、核酸と反応していないスライドガラス表面の余分なアミノ基をブロックするため、ホウ酸、純水、PH調整用NaOH、無水コハク酸、1-メチル-2-ピロリドンと混合した溶液(無水コハク酸 8gを187ml 1-メチル-2-ピロリドンに溶解し、使用直前に17ml 1M Na-borate (PH8.0) 溶液を加えたもの)に核酸が固定された面を浸し、振とうした。その後、洗浄した。

30

40

#### 【0084】

##### RNAの処理

RNA溶液(宝酒造(株)製「λPolyA+RNA-A」:製品番号TX802)を用意し、実施例2のRNA処理と同様に行い、C×5色素が取り込まれたcDNA溶液、C×3色素が取り込まれたcDNA溶液およびハイブリタイゼーション溶液を得た。

#### 【0085】

##### ハイブリタイゼーション

2種類の核酸が表面に固定された核酸固定基材をハイブリダイゼーション装置の基台上に固定し、核酸固定部位の両側に配置された金電極とハイブリダイゼーション装置の交流電圧印加手段を接続した。さらに、垂直移動用下部電極につながる導電パターン配線に直流

50



電圧および交流電圧印加手段を接続した。2種類の核酸を固定した部位に2 $\mu$ lの前記ハイブリダイゼーション溶液を滴下し、核酸固定部位の両側の電極上にカバー基材を架設し、ハイブリダイゼーション溶液が蒸発しないように密閉した。その後、実施例2と同様に各電極間に電圧を印加し、ハイブリダイゼーションを行った後、カバー基材、電極を取り外し、洗浄した。

【0086】

さらに、従来法と比較する為に、平行移動用電極間および垂直移動用電極間に電圧を印加しない状態で65℃の条件で16時間放置したサンプルを用意した。その後、該サンプルのカバー基材、電極を取り外し、洗浄した。

【0087】

蛍光検出

C $\times$ 5およびC $\times$ 3からの蛍光を測定するために、光学系は実施例2の光学系と同様にし、C $\times$ 5およびC $\times$ 3からの蛍光を検出した。

【0088】

このような方法で、上記のハイブリダイゼーション後の2種類核酸固定部位からの蛍光をC $\times$ 5、C $\times$ 3のそれぞれについて測定した。TX808の核酸溶液をスポッティングした核酸固定部位からは、C $\times$ 5の蛍光のみが観察され、C $\times$ 3の蛍光は検出されなかった。TX806の核酸溶液をスポッティングした核酸固定部位からは、C $\times$ 3だけの蛍光が観察され、C $\times$ 5からの蛍光は検出されなかった。

【0089】

また、このときの電圧を印加した核酸固定基材から得られた蛍光強度は電圧を印加しない従来の方法に比べて同等であった。また、各核酸固定部位内の蛍光強度分布を詳細に観察すると、従来法に比べて本発明の方法の方が均一な強度分布を示した。このように、スライドガラスに導電性パターンを配設し、核酸固定部位近傍の核酸濃度を高くするための電圧と、プローブ核酸とターゲット核酸を相対的に移動させ、衝突確率を高めるための電圧を印加することにより、わずか10分のハイブリダイゼーションの時間でも十分な結合反応が行われ、かつ場所による偏りの少ない均一な結合反応状態が得られることが分かった。

【0090】

実施例4

選択結合物質固定基材の前処理

ガラス成形により76mm $\times$ 26mm $\times$ 1mmのガラス基板上に直径200 $\mu$ m、高さ200 $\mu$ mの円柱状の凸部が500 $\mu$ m間隔で5mm $\times$ 5mmの領域に格子状に配列した凸部配列基板を用意した。該凸部の配列に対応する開口部と、それぞれの開口部を幅10 $\mu$ mの開口パターンで接続し、前記ハイブリダイゼーション装置に設けられた電極に接続する電極部を形成するための開口部に前記開口パターンを集束したステンレス製マスクを前記凸部配列基板状に該凸部と該凸部に対応する開口部が合するように装着し、スパッタ法により凸部端面に垂直移動用下部電極、および前記開口部形状に相当する金電極を設けた。さらに、平行移動用電極を形成するために設けた10mm $\times$ 5mmの開口の10mmの辺が10mmの間隔を隔てて平行に対向するように、2つの開口部と、垂直移動用下部電極と導電パターン配線を形成するために開口パターンを配置したステンレス製マスクをスライドガラス上に近接させて装着し、スパッタ法により前記マスクの開口部形状に相当する金電極を前記凸部配列基板上的前記凸部が配列された領域の両側に設けた。

【0091】

このように金電極を配置したスライドガラス(76mm $\times$ 26mm $\times$ 1mm)(松浪硝子工業(株)製)を純水、エタノール、NaOHの混合溶液でクリーニングした後、純水で洗浄した。さらに、クリーニングした面を純水、ポリーレーリシンの混合溶液(組成:10%ポリーレーリシン)に浸し、スライドガラスの表面にアミノ基を導入した。

【0092】

核酸溶液2種類(宝酒造(株)製 「λControl Template & Pri

10

20

30

40

50

mer Set-A」：製品番号TX808（約1000bpのλ DNA断片）、および、宝酒造（株）製「Human TFR（1kb）Template & Primer Set」：製品番号TX806（約1000bpのヒトトランスフェリンレセプターDNA断片）を元に、それぞれの核酸をPCR法により増幅した。PCR法を用いたプライマーは、それぞれの製品に同梱されているものを用いた。これを精製し、精製した核酸溶液をえた。スライドガラスの前記金電極の間のアミノ基を導入した面に精製した2種類の核酸溶液をスポッティングし、空気中で乾燥後、UVクロスリンク（120mJ）を行い、2種類の核酸が核酸固定部位に固定された核酸固定基材をえた。次に、核酸と反応していないスライドガラス表面の余分なアミノ基をブロックするため、ホウ酸、純水、PH調整用NaOH、無水コハク酸、1-メチル-2-ピロリドンと混合した溶液（無水コハク酸 3gを187ml 1-メチル-2-ピロリドンに溶解し、使用直前に17ml 1M Na-borate（PH8.0）溶液を加えたもの）に核酸が固定された面を浸し、振とうした。その後、洗浄した。

【0093】

#### RNAの処理

RNA溶液（宝酒造（株）製「λPolynA+RNA-A」：製品番号TX802）を用意し、実施例2のRNA処理と同様に行い、C×5色素が取り込まれたcDNA溶液、C×8色素が取り込まれたcDNA溶液およびハイブリダイゼーション溶液を得た。

【0094】

#### ハイブリダイゼーション

2種類の核酸が表面に固定された凸部配列基板をハイブリダイゼーション装置の基台上に固定し、核酸固定部位の両側に配置された金電極とハイブリダイゼーション装置の交流電圧印加手段を接続した。さらに、垂直移動用下部電極につながる導電パターン配線に直流電圧および交流電圧印加手段を接続した。2種類の核酸を固定した部位に2μlの前記ハイブリダイゼーション溶液を滴下し、核酸固定部位の両側の電極上にカバー基材を架設し、ハイブリダイゼーション溶液が蒸発しないように密閉した。その後、実施例2と同様に各電極間に電圧を印加し、ハイブリダイゼーションを行った後、カバー基材、電極を取り外し、洗浄した。

【0095】

さらに、従来法と比較する為に、平行移動用電極間および垂直移動用電極間に電圧を印可しない状態で65℃の条件で16時間放置したサンプルを用意した。これを、65℃の条件で16時間放置した後、カバー基材を取り外し、洗浄した。

【0096】

#### 蛍光検出

C×5およびC×8からの蛍光を測定するために、光学系は実施例2の光学系と同様にし、C×5およびC×8からの蛍光を検出した。

【0097】

このような方法で、上記のハイブリダイゼーション後の2種類核酸固定部位からの蛍光をC×5、C×8のそれぞれについて測定した。TX808の核酸溶液をスポッティングした核酸固定部位からは、C×5の蛍光のみが観察され、C×8の蛍光は検出されなかった。TX806の核酸溶液をスポッティングした核酸固定部位からは、C×8だけの蛍光が観察され、C×5からの蛍光は検出されなかった。

【0098】

また、このときの電圧を印加した核酸固定基材から得られた蛍光強度は電圧を印加しない従来の方法に比べて同等であった。また、各核酸固定部位内の蛍光強度分布を詳細に観察すると、従来法に比べて本発明の方法の方が均一な強度分布を示した。このように、スライドガラスに導電性パターンを配設し、核酸固定部位近傍の核酸濃度を高くするための電界と、プローブ核酸とターゲット核酸を相対的に移動させ、衝突確率を高めるための電圧を印加することにより、わずか10分のハイブリダイゼーションの時間でも十分な結合反応が行われ、かつ場所による偏りの少ない均一な結合反応状態が得られることが分かった

## 【0099】

## 実施例5

ガラス加工により76mm×26mm×1mmのガラス基板に、直径約200μmの貫通孔を500μm間隔で5mm×5mmの領域に格子状に配列したガラス基板を用意した。該ガラス基板の貫通孔に、直径200μmの光ファイバーを貫通させ、ガラス基板の表面から該光ファイバーが200μmの高さまで突出した位置で光ファイバーを固定し、突出した面と反対面の端面で切断した。これにより、実施例4で用いた凸部配列基板と同等の外観形状を有する光ファイバー貫通型基板を得た。これに、実施例4で用いた前記ステンレス製マスクを用いて、スパッタ法により、光ファイバー端面に垂直移動用下部電極、前記光ファイバーが配列された領域の両側に平行移動用電極、および前記光ファイバー配列を接続する導電パターンを設けた。

10

## 【0100】

このように金電極を配置した光ファイバー貫通型基板を純水、エタノール、NaOHの混合溶液でクリーニングした後、純水で洗浄した。さらに、クリーニングした面を純水、ポリリーリシンの混合溶液（組成：10% ポリリーリシン）に浸し、該光ファイバー貫通型基板の表面にアミノ基を導入した。

## 【0101】

核酸溶液2種類（宝酒造（株）製「λControl Template & Primer Set-A」；製品番号TX803（約1000bpのλ DNA断片）、および、宝酒造（株）製「Human TFR(1kb) Template & Primer Set」；製品番号TX806（約1000bpのヒトトランスフェリンレセプターDNA断片））を元に、それぞれの核酸をPCR法により増幅した。PCR法で用いたプライマーは、それぞれの製品に同梱されているものを用いた。これを精製し、精製した核酸溶液を得た。前記光ファイバー貫通型基板の突出した光ファイバー端面に精製した2種類の核酸溶液をスポットニングし、空気中で乾燥後、UVクロスリンク（120mJ）を行い、2種類の核酸が核酸固定部位に固定された核酸固定基材をえた。次に、核酸と反応していない光ファイバー端面の余分なアミノ基をブロックするため、ホウ酸、純水、PH調整用NaOH、無水コハク酸、1-メチル-2-ピロリドンと混合した溶液（無水コハク酸 3gを187ml 1-メチル-2-ピロリドンに溶解し、使用直前に17ml 1M Na-borate (PH8.0) 溶液を加えたもの）に核酸が固定された面を浸し、振とうした。その後、洗浄した。

20

30

## 【0102】

## RNAの処理

RNA溶液（宝酒造（株）製「λPolyA+RNA-A」；製品番号TX802）を用意し、実施例2のRNA処理と同様に行い、C×5色素が取り込まれたcDNA溶液、C×3色素が取り込まれたcDNA溶液およびハイブリダイゼーション溶液を得た。

## 【0103】

## ハイブリダイゼーション

2種類の核酸が表面に固定された光ファイバー貫通型基板をハイブリダイゼーション装置の基台上に固定し、核酸固定部位の両側に配置された金電極とハイブリダイゼーション装置の交流電圧印加手段を接続した。さらに、垂直移動用下部電極につながる導電パターン配線に直流電圧および交流電圧印加手段を接続した。2種類の核酸を固定した部位に2μlの前記ハイブリダイゼーション溶液を滴下し、核酸固定部位の両側の電極上にカバー基材を架設し、ハイブリダイゼーション溶液が蒸発しないように密閉した。その後、実施例2と同様に各電極間に電圧を印加し、ハイブリダイゼーションを行った後、カバー基材、電極を取り外し、洗浄した。

40

## 【0104】

さらに、従来法と比較する為に、平行移動用電極間および垂直移動用電極間に電圧を印加しない状態で65℃の条件で16時間放置したサンプルを用意した。その後、該サンプル

50

のカバー基材、電極を取り外し、洗浄した。

【0105】

蛍光検出

C $\times$ 5およびC $\times$ 3からの蛍光を測定するために、光学系は実施例2の光学系と同様にし、C $\times$ 5およびC $\times$ 3からの蛍光を検出した。

【0106】

このような方法で、上記のハイブリダイゼーション後の2種類核酸固定部位からの蛍光をC $\times$ 5、C $\times$ 3のそれぞれについて測定した。TX808の核酸溶液をスポットティングした核酸固定部位からは、C $\times$ 5の蛍光のみが観察され、C $\times$ 3の蛍光は検出されなかった。TX806の核酸溶液をスポットティングした核酸固定部位からは、C $\times$ 3だけの蛍光が観察され、C $\times$ 5からの蛍光は検出されなかった。

10

【0107】

また、このときの電圧を印加した核酸固定基材から得られた蛍光強度は電圧を印加しない従来の方法に比べて同等であった。また、各核酸固定部位内の蛍光強度分布を詳細に観察すると、従来法に比べて本発明の方法の方が均一な強度分布を示した。このように、スライドガラスに導電性パターンを配設し、核酸固定部位近傍の核酸濃度を高くするための電圧と、プローブ核酸とターゲット核酸を相対的に移動させ、衝突確率を高めるための電圧を印加することにより、わずか10分のハイブリダイゼーションの時間でも十分な結合反応が行われ、かつ場所による偏りの少ない均一な結合反応状態が得られることが分かった。

20

【0108】

【発明の効果】

本発明の選択結合性物質のハイブリダイゼーション方法、ハイブリダイゼーション装置および選択結合性物質固定用基材を用いることにより、ハイブリダイゼーション効率が向上し、かつ結合反応部位における反応の偏りが緩和され、短時間でハイブリダイゼーション工程を完了し、均一なハイブリダイゼーション結果を得ることができると。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のハイブリダイゼーション装置の断面図(a)および平面図(b)である。

【図2】本発明における選択結合性物質の動作を示す原理図である。

30

【図3】従来のハイブリダイゼーション装置の断面図である。

【図4】従来のハイブリダイゼーション装置における選択結合性物質の動作を示す原理図である。

【図5】本発明における各電極への電圧印加パターンである。

【符号の説明】

- 1 選択結合性物質固定用基材
- 2 平行移動用電極
- 3 平行移動用電極
- 4 垂直移動用下部電極
- 5 選択結合性物質固定部位
- 6 カバー基材
- 7 垂直移動用上部電極
- 8 選択結合性物質配列領域
- 9 交流電圧印加手段
- 10 導電パターン
- 11 コネクタ
- 12 直流電圧および交流電圧印加手段
- 13 被検試料溶液
- 14 基台
- 15、15' 選択結合性物質

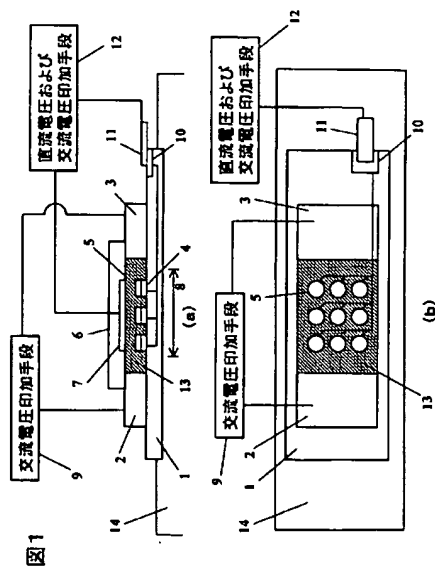
40

50

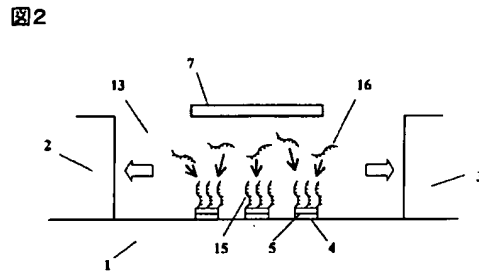
- 16、16' 対応選択結合性物質
- 17 選択結合性物質固定用基材
- 18 支持材
- 19 垂直移動用下部電極
- 20 選択結合性物質固定部位
- 21 カバー基材
- 22 垂直移動用上部電極
- 23 被検試料溶液
- 24 電圧印加手段
- 25 ゲート信号
- 26 直流および交流電圧印加パターン
- 27 交流電圧印加パターン
- 28 直流電圧および交流電圧印加手段ON区間
- 29 交流電圧印加手段ON区間

10

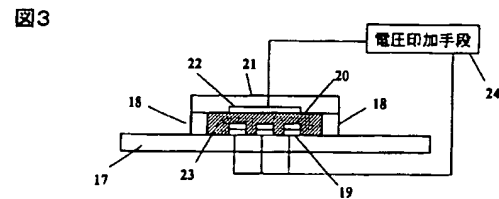
【図1】



【図2】

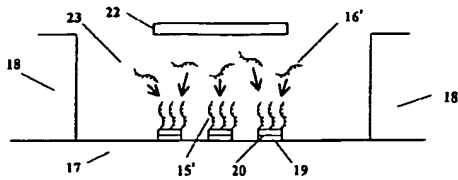


【図3】



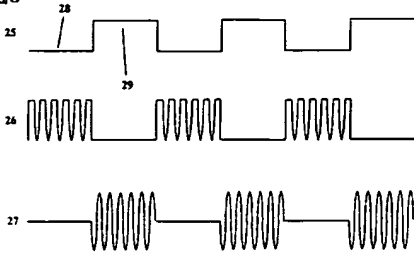
【図 4】

図 4



【図 5】

図 5



## フロントページの続き

(51)Int. Cl.<sup>7</sup>

G 0 1 N 27/416

G 0 1 N 33/483

G 0 1 N 37/00

F I

G 0 1 N 33/483

G 0 1 N 37/00

G 0 1 N 27/46

G 0 1 N 27/46

C 1 2 N 15/00

F

1 0 2

3 3 6 M

3 3 6 B

F

テーマコード (参考)